FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année 1961 - N° 275

Variations quantitatives des différents lipides aortiques chez le lapin normal et atherosclereux sous l'action d'un apport d'acides amines, de fructo aminoacides et d'A.T.P.

(Travail du Laboratoire de chimie biologique et médicale de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon)

THESE

PRÉSENTÉE A LA

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 22 Décembre 1961

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

PAR

Gérald FRAY

Né le 11 Janvier 1928 à BONE (Algérie)

Imp. CHRÉTIEN-PAVIOL - LYON

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550007_0015

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

FACULTE MIXTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE LYON

PERSONNEL de la FACULTE

M. J. LEPINE: Doyen Honoraire
Membre de l'Institut

M. H. HERMANN: Doyen
Correspondant de l'Institut

MM. M. LEVRAT, Assesseur
L. REVOL , Assesseur

Professeurs Honoraires

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY.

Professeurs

MM.	HERMANN	Physiologie
	CIBERT	Clinique Urologique
	PONTHUS (détaché à Beyrouth)	Physique Biologique
	DECHAUME	Clinique Neuro-Psychiatrique et Hygiène Mentale
	ROCHET	Thérapeutique Chirurgicale et Chirurgie Opératoire
	CHAMBON	Chimie Organique et Toxicologie
	WERTHEIMER	Clinique Chirurgicale B
	PAUPERT-RAVAULT	Clinique Médicale B
	FROMENT	Clinique et Prophylaxie Cardio-Vasculaires
	CROIZAT	Clinique Médicale C
	ENSELME	Chimie Biologique et Médicale
	MALLET-GUY	Clinique Chirurgicale A
	GUILLEMINET	Clinique de Chirurgie Orthopédique et de Chirurgie Infantile
	REVOL	Pharmacie Galénique et Matière Médicale
	POLLOSSON	Clinique Gynécologique
	PIGEAUD	Clinique Obstétricale
	BOURRET	Médecine du Travail
	LEVRAT	Clinique Médicale A
	SOHIER	Hygiène et Action Sanitaire et Sociale
	DUCLOS	Clinique Stomatologique
	BERNHEIM	Clinique Médicale Infantile et Hygiène du Premier Age
	JOURDAN	Biologie Médicale et Pharmacodynamie
	NETIEN	Botanique et Cryptogamie
	BERTRAND	Clinique Chirurgicale C
	BADINAND	Chimie Analytique Pharmaceutique
	DREVON	Pharmacie Chimique et Pharmacologie
	ROCHE	Médecine Légale et Déontologie
	COUDERT	Parasitologie et Pathologie Exotique
	MOUNIER-KUHN	Clinique d'Oto-Rhino-Laryngologie et d'Audio-Phonologie
	PAUFIQUE	Clinique Ophtalmologique
	THIERS	Clinique de Dermatologie, Syphiligraphie et Allergologie
	BRUN	Clinique de Pneumo-Phtisiologie

CREYSSEL	Clinique Traumatologique des Membres
DARGENT	Cancérologie
GUICHARD	Anatomie Pathologique
GIRARD Paul	Pathologie Générale et Expérimentale
LATARJET	Anatomie
PEYCELON	Pathologie Chirurgicale
GIRARD Marcel	Thérapeutique
VACHON	Pathologie Médicale
GALY	Physio-Pathologie des Voies Respiratoires
KEHL	Histologie et Embryologie
PAPILLON	Radiologie
JEUNE	Clinique des Maladies Infectieuses
GONIN	Hydrologie Thérapeutique, Climatologie et Ecologie Sociale
MONNET	Bactériologie

Professeurs à titre personnel

MM.	BERGER	Physique Nucléaire appliquée à la Médecine
	DORCHE	Technologie Pharmaceutique

Professeurs sans Chaire

MM.	BANSSILLON	Obstétrique	CHATONNET	Physiologie
	ROMAN	Parasitologie	CIER André	Pharmacie Chimique & Pharmacologie
	BERTOYE	Bactériologie		
	CIER J.François	Physiologie	PERROT	Chimie Organique & Toxicologie

Maîtres de Conférences - Agrégés

Médecine

MM.	FEROLDI	Anatomie Pathologique
	CREYSSEL Roger	Chimie Biologique et Médicale
	DUROUX Emile	Anatomie
	BRETTE René	Thérapeutique
	DUMONT Louis	Histologie
	THIVOLET Jean	Hygiène
	GARIN J.Paul	Parasitologie
	MORET Robert	Physique
	BOUCHET Alain	Anatomie
	TOMMASI Michel	Anatomie Pathologique
	RIFFAT Georges	Hygiène
	JOUVET Michel	Pathologie Expérimentale
	FAVRE-GILLY J.	Hématologie

Pharmacie

ODDOUX Lucien	Botanique et Cryptogamie
MALLEIN René	Chimie Analytique
GRAS Jean	Chimie Biologique
PEYRIN J.Olivier	Physique

Agrégés en Exercice

MM. MATHIEU Jacques	Obstétrique
MARION Joseph	Orthopédie
GUINET Paul	Médecine Générale
PONT Maurice	Médecine Générale
VIGNON Georges	Médecine Générale
REVOL Louis	Médecine Générale
PLAUCHU Marcel	Médecine Générale
TRAEGER Jules	Médecine Générale
MARION Pierre	Chirurgie Générale
MICHAUD Pierre	Chirurgie Générale
JAUBERT de BEAUJEU Michel	Chirurgie Générale
SAUTOT Jean	Chirurgie Générale
GUILLEMIN Georges	Chirurgie Générale
BURTHIAULT René	Obstétrique
GIGNOUX Marcel	Oto-Rhino-Laryngologie
FRANCOIS René	Pédiatrie
FREIDEL Charles	Stomatologie
DEVIC Michel	Médecine Générale
DESPIERRES Charles	Médecine Générale
De MOURGUES Georges	Chirurgie Générale
FRANCILLON Jacques	Chirurgie Générale
SAUBIER Eugène	Chirurgie Générale
COLOMB Daniel	Dermatologie
COLIN Marcel	Médecine Légale
TOLOT François	Médecine du Travail
GUYOTAT Jean	Neuro-Psychiatrie
SCHOTT Bernard	Neuro-Psychiatrie
DUMONT Martial	Obstétrique
BONAMOUR Georges	Ophtalmologie
DURAND Louis	Urologie
GARDE Alexandre	Médecine Générale
PERRIN André	Médeince Générale
LARBRE François	Médecine Générale
MORNEX René	Médecine Générale
NORMAND Jean	Médecine Générale
MARET Gilbert	Chirurgie Générale
DESCOTES Jacques	Chirurgie Générale
CHASSARD Jean-Louis	Electro-Radiologie
ALLEGRE Georges	Neuro-Chirurgie
HUGONNIER René	Ophtalmologie
FAYSSE Robert	Orthopédie
GAILLARD Jean	Oto-Rhino-Laryngologie
KALB Jean-Claude	Pneumo-Phtisiologie

EXAMINATEURS DE LA THESE :

MM. ENSELME Président
CIER J.F.
PERRIN A.
GRAS J.

A LA MEMOIRE DE MES GRANDS PARENTS,

A LA MEMOIRE DE MON FRERE

A MES PARENTS

A MA FEMME

A MES ENFANTS

A MES BEAUX PARENTS

A Monsieur le Professeur ENSELME,

Nous lui devons ce travail.

Il nous a guidé et encouragé avec bienveillance dans les moments d'aridité.

C'est avec joie que nous continuerons à travailler sous sa direction.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J.F. CIER

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGE J. GRAS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGE A. PERRIN

Ils nous ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail, nous leur adressons nos respectueux remerciements.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LEMAIRE

C'est dans son service de l'hôpital Saint-Antoine qu'ont été réalisés les dosages exposés dans les résultats de notre première partie.

Nous le remercions bien vivement d'avoir voulu permettre cette collaboration entre les deux laboratoires de LYON et de PARIS.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR FROMENT

Nous le remercions vivement de l'accueil reçu dans son service. Nous lui exprimons notre reconnaissance pour la bienveillance qu'il nous a témoignée.

A MONSIEUR LE DOCTEUR COTTET
Ancien Chef de Clinique à la Faculté de Médecine de PARIS

qui a participé à nos recherches et nous a aidé de ses précieux conseils.

AU REVEREND PERE P.M. FARNE DES PERES BLANCS

AU DOCTEUR J. FREY

Nous tenons à remercier particulièrement
Madame Y. GUDEFIN, Laborantine, qui nous
a apporté un concours précieux dans l'exécution
et la surveillance de l'expérimentation animale.

- I N T R O D U C T I O N -

Nous présentons une série d'expériences destinées à étudier l'action sur la paroi aortique de lapins soumis à un régime athérosclérogène d'un mélange d'acides aminés, de fructo-aminoacides de BORSOOK et d'A.T.P.

Ce mélange se propose de provoquer une biogénèse protéique destinée à éviter ou à réparer les lésions de l'athérome.

Les différentes voies d'apport, parentérale et orale ont été étudiées séparément.

On a essayé d'"estimer" les effets de ce mélange :

- en dosant dans le sang les lipides totaux, le cholestérol et les bêtalipoprotéines ;
- par l'examen macroscopique des aortes après sacrifice des animaux en s'aidant d'une coloration des lipides originale, rapide et simple ;
- en dosant les différentes formes de lipides aortiques.

A propos de ce travail nous avons été amené à mettre au point une technique de séparation quantitative des différentes classes de lipides extraits de l'aorte au moyen de la chromatographie sur colonne d'acide silicique.

-=-=-=-=-=-=-=-=-

CHAPITRE PREMIER

Du rôle des acides aminés de la sérumalbumine, des fructoaminoacides, de l'A.T.P. sur la formation des dépôts lipidiques et l'imprégnation de l'aorte dans "l'athérosclérose" expérimentale du lapin.

I - IDEES GENERALES SUR LA TECHNIQUE D'ETUDE

L'étude d'un facteur actif sur l'athérosclérose comportera les temps suivants :

1º) - Les animaux ayant été préparés, ils sont sacrifiés et les aortes sont examinées suivant une technique de coloration qui nous est originale. Elle permet de voir nettement les dépôts lipidiques sur la paroi artérielle.

2º) - Des coupes histologiques sont pratiquées à ce niveau, elles montrent :

- la pénétration locale des lipides,
- la réaction des tissus aortiques.

3º) - Un dosage des différentes formes de lipides dans l'aorte de l'animal montre l'importance de l'envahissement de cet organe par les divers lipides.

La préparation des animaux a été réalisée par des ingestions massives (mais peu physiologiques) de cholestérol. Celles-ci provoquent chez certains animaux, essentiellement le lapin et la poule, des manifestations anatomiques, histologiques et chimiques qui rappellent celles de l'athérosclérose.

On compare le plus souvent une série témoin à une série qui a reçu le facteur dont on veut éprouver l'activité.

II - HYPOTHESES DE DEPART CONCERNANT L'EXPERIENCE QUE NOUS RAPPORTONS

Nous avons été guidés, dans l'expérience que nous allons décrire, par une hypothèse de travail qui peut se résumer ainsi :

1º) - dans l'athérosclérose spontanée, les lipides ne sont pas les seuls éléments en cause ; on peut se demander si les protides de la paroi vasculaire ne sont pas altérés. C'est au niveau de ces altérations que se feraient peut-être (probablement par adsorption) les premiers dépôts lipidiques.

2º) - dans l'athérosclérose provoquée, l'énorme masse de lipides mise en circulation dans le sang détermine des dépôts qui asphyxient la portion de paroi recouverte et déclenche ainsi une série de réactions protéiques qui reproduit alors le mécanisme décrit pour l'athérosclérose spontanée.

3º) - C'est à une étude des réactions protéiques que sont consacrées nos expériences. Nous avons espéré que tout phénomène qui favorise un état normal des protides pariétaux et une reproduction rapide de leur molécule doit diminuer les anomalies lipidiques que nous avons précédemment passées en revue.

4º) - La biosynthèse des protides comporte probablement l'ensemble des temps suivants :

a) - Phénomènes métaboliques : apport des acides aminés nécessaires à cette synthèse, leur passage plus ou moins sélectif dans la cellule.

b) - Apport d'éléments énergétiques : A.T.P., G.T.P. et des corps nécessaires à leur reconstitution après usage, par exemple le phosphoénolpyruvate et sa kinase pyruvique.

c) - La présence des éléments enzymatiques de cette synthèse : les enzymes p_H5.

d) - La présence des "moules"nucléoprotéiques spécifiques: acide ribonucléique soluble et insoluble du cytoplasme.

Nous avons divisé cette étude en deux temps :

- Dans un premier temps nous avons simplement réalisé un apport excessif d'acides aminés et nous avons choisi pour celà les acides aminés de la sérumalbumine, cette protéine étant généralement l'agent vecteur des acides aminés des différentes biosynthèses. En outre, nous avons ajouté des fructo-aminoacides décrits par BORSOOK (3) et qui, pour cet auteur, semblent être une des formes actives des biosynthèses protéiques. Nous n'avons utilisé qu'un seul élément énergétique : l'A.T.P.

  C'est le compte rendu des résultats obtenus dans ce premier temps qui va faire l'objet de ce chapitre.

- Dans un deuxième temps nous nous proposons d'étudier in vitro l'activité des autres facteurs.

  Il n'en sera pas question dans ce travail.

III - TECHNIQUES GENERALES

Les techniques que nous avons employées peuvent se résumer ainsi :

1º) - Les animaux en expérience

Nous avons utilisé des lapins de sexe mâle pesant au départ de deux à trois kilos. Ils avaient fait un séjour préalable de deux mois au laboratoire soumis au régime standard que nous décrivons. Chaque animal est enfermé dans une cage individuelle dont les dimensions sont : 0,32 x 0,32 x 0,57 m. On change les animaux de place dans la pièce qui leur est réservée toutes les trois semaines. Les cages sont alors désinfectées par brûlage au chalumeau oxyacétylinique. On procède de telle façon que chaque lapin subisse pendant le même temps les mêmes influences microclimatiques. La pièce qui contient les cages comporte une grande fenêtre et deux portes. Le plancher des cages est formé par un grillage qui laisse passer les déjections. L'animal ne peut donc se livrer à la coprophagie.

L'alimentation est constituée d'environ 100 grammes par animal et par jour de régime "Sorolabo C 17" dont voici la composition :

- Orge, Avoine
- Melasse
- Remoulage et germes de blé
- Farine de luzerne déshydratée
- Tourteaux de soja, arachides, palmistes et lin
- Composé minéral vitaminisé (A.D.)

2º) - Le cholestérol

Nous utilisons du cholestérol type "codex" de la firme "SOPROTEC" contenant 3 % de compagnons du cholestérol. Il est administré en suspension dans de l'huile d'olive : un gramme de cholestérol pour trois grammes d'huile d'olive. On ajoute de la caséine dans le but d'augmenter l'attirance de l'animal pour ce produit. Après une courte phase d'adaptation les animaux paraissent en être très friands.

3º) - Produits utilisés

Suivant les expériences nous avons utilisé soit des injections alternées intramusculaire et intrapéritonéale, soit la voie orale. Nous indiquerons pour chaque expérience la technique employée.

Chaque animal reçoit le mélange :

- produit d'hydrolyse de la fraction V
- Fructoaminoacides
- glucose
- A.T.P.

Les proportions varient d'une expérience à l'autre.

Les produits sont préparés de la façon suivante :

- Les acides aminés d'origine sérique :

a) - On isole l'albumine par la méthode VI-IX de Cohn à l'alcool.

b) - On pratique l'hydrolyse du produit par HCl 6N à I20º ; on décolore une première fois par de l'acticarbone ; on évapore à l'air libre à I00º pendant 48 heures puis sous vide à l'ébullition jusqu'à consistance pateuse à chaud et solide à froid. On dissout le produit dans I5 litre d'eau. On traite de nouveau par l'acticarbone. On neutralise avec 300 grammes de NaOH pour 20 litres au total.

- Obtention des fructoaminoacides au moyen de la réaction d'Amadori:

a) - L'alanine-fructose, on mélange :

- dl-alanine "Roche" ..... I2,5 g
- d(+) glucose anhydre R.P. ..... I78,5 g
- Méthanol anhydre ..... 5000 ml

On chauffe au bain marie sous réfrigérant à reflux l'acide aminé et les trois quart du méthanol pendant dix minutes. On ajoute ensuite le glucose dans le reste du méthanol. On laisse bouillir sous réfrigérant à reflux pendant deux heures et quart. On fait une dessication sous vide (trompe à eau) à 45º de température. On obtient un sirop : le vide cassé, le produit prend un aspect de mélasse. On dissout dans un peu d'eau distillée stérile. On remet sous vide pendant deux à trois heures et on va jusqu'à dessication pour éliminer les dernières traces de méthanol. On ajuste ensuite à 25 % avec de l'eau distillée stérile. Le volume total est de 764 ml. On conserve au congélateur à - 40º.

b) - Acide glutamique-fructose, on mélange :

- acide glutamique l(+) Merck ..... I5 g
- d (+) glucose anhydre R.P.....2I4 g
- Potasse ..... 5,7 g
- Méthanol anhydre R.P. .....6000 ml

On ajoute l'acide glutamique et la potasse au trois-quart du méthanol. On chauffe au bain marie sous réfrigérant à reflux pendant dix minutes. On ajoute le glucose avec le reste du méthanol. On laisse bouillir sous réfrigérant à reflux pendant trois heures quinze. La dessication se fait comme pour l'alanine. La solubilité du produit permet une solution à 50 %. Le volume total est de 469 ml. On conserve au congélateur à - 40º.

Remarque

au cours d'essais préliminaires sur de petites quantités, on a suivi la réaction à intervalles réguliers par réduction du ferricyanure de potassium et formation de bleu de prusse. Les techniques de dosage ont été légèrement différentes de celles indiquées par BORSOOK, ABRAMS et LOWY (3).

Dans tous les cas, aussi bien avec l'analine glucose qu'avec l'acide glutamique glucose, on n'a pu obtenir de courbe avec palier au temps indiqué mais une courbe ascendante même avec cinq à six heures de chauffage. Le liquide devient alors de plus en plus jaune brun. On a donc arrêté le chauffage après le temps indiqué par ABRAMS, LOWY et BORSOOK (1), soit deux heures quinze pour l'analine glucose et trois heures quinze pour l'acide glutamique glucose.

c) - Le mélange des corps précédents est amené à 20 litres. On ajoute 5 grammes d'A.T.P. On répartit dans 200 flacons de 250 ml chacun. On y met I00 ml et on tyndallise.

Analyse des produits : l'albumine du sérum qui sert à la préparation des acides aminés par hydrolyse a été étudiée par électrophorèse libre : les valeurs moyennes sont de 96 % d'albumine de mobilité 6.5 $I0^5$ cm^2 volt $^{-I}$ sec $^{-1}$ et 4 % de globuline alpha I de mobilité 4.8 $I0^5$ cm^2 volt $^{-I}$ sec $^{-I}$.

La valeur de Nbt (selon COURTOIS J.E. et DELRIEU P. -7-) est le chiffre théorique de I43.

Après hydrolyse, la réaction du biuret a complètement disparue.

On détecte le fructose des fructoaminoacides par les réactions de Folin-Malmros et de Selivanoff, toutes les deux très positives.

4º) - Constitution des séries expérimentales d'animaux

Les séries expérimentales sont constituées par tirage au sort. L'exemple suivant illustre la méthode :

si nous voulons constituer 4 séries expérimentales de I2 animaux (séries A - B - C - D) nous prenons au hasard 48 animaux aptes à l'expérimentation et, isolant chacun des animaux les uns après les autres, nous tirons un numéro qui leur est ainsi imposé par le hasard. Nous avons ainsi quatre séries :

1 à I2	série A
I3 à 24	série B
25 à 36	série C
37 à 48	série D

pour affecter chacune des séries, nous tirons au sort le rôle de chacune d'elle dans l'expérience : série témoin, série traitée.

Le tirage au sort est fait par des personnes ignorant totalement la signification de l'expérience.

Toutes les affectations sont donc bien dûes au hasard.

IV - TECHNIQUE D'ETUDE DU SERUM

Des prises de sang dans le coeur du lapin sont pratiquées au début et à la fin de l'expérience.

Le cholestérol est dosé par la méthode de Delsal (I3), ainsi que les lipides totaux.

L'électrophorèse libre est pratiquée suivant la méthode de Tiselius, au moyen de l'appareil fourni par la firme Perkin-Elmer.

Les bêta-lipoprotéines sont dosées par la méthode de Burstein (5).

Les protéines totales sont estimées par la technique de Gornall (I7).

V - TECHNIQUE D'ETUDE DU TISSU ARTERIEL

L'examen macroscopique des dépôts lipidiques est pratiqué après coloration par le Soudan III selon la technique suivante :

- l'aorte est immergée une minute dans l'éthanol à 70 %,
- elle est ensuite abandonnée dans une solution saturée de Soudan III,
- elle est de nouveau trempée une minute dans l'éthanol à 70 %.

On décolore enfin par le formol à IO % les parties non lipidiques.

Le comportement du Soudan est variable selon l'échantillon utilisé. Il faut parfois employer non une solution à saturation mais une solution diluée.

Les méthodes de dosage chimique seront exposées dans la deuxième partie.

Les animaux sont désignés pour le sacrifice par un tirage au sort. L'examen est fait par une personne ignorant le numéro de l'animal et la signification de la série.

VI - PREMIERE SERIE D'EXPERIENCE

1º) - Conditions expérimentales

Les animaux reçoivent pendant deux mois un gramme de cholestérol chaque jour, soit au total soixante grammes. Trois animaux sacrifiés ne présentant aucune lésion, on porte la dose de cholestérol à deux grammes par jour pendant quinze jours : soit trente grammes.

Les animaux ont donc ingéré 90 grammes de cholestérol au total.

Les animaux traités ont reçu chaque jour, en injection intramusculaire et intrapéritonéale alternées, dix millilitres d'une solution contenant pour ce volume :

- Produit d'hydrolyse de la fraction V ..... 0,75 g
- Fructoaminoacides ..... 0,0I4 g
- Glucose ..... 0,20 g
- A.T.P. ..... 0,0025 g

Le pH de cette solution est de 6,75.

2º) - Résultats

Poids des lapins (moyennes)

Témoins		Traités	
Avant	Après	Avant	Après
2,400 g	2,750 g	2,270 g	2,050 g

- Protéines totales en grammes pour cent millilitres -

TEMOINS			TRAITES		
Nº des lapins	Avant	Après	Nº des lapins	Avant	Après
7	6,37	9,45	8	5,80	9,55
9	5,55	8,70	I0	5,75	
11	7,40	9,50	I2	6,55	8,80
I3	6,55	8,70	I4	5,80	6,25
I5	6,I5	8,60	I7	6,45	8,00
I8	5,95	8,00	20	6,35	5,95
2I	6,73	9,70	22	6,85	7,85
Moyennes	6,90	8,95	Moyennes	6,22	7,73

Contrairement à ce que nous aurions pu penser les protéines du sérum sont chez les naimaux traités inférieures à celles des animaux témoins. Faut-il penser qu'il s'agit d'une activité métabolique accrue au niveau des tissus ?

- Bêta-lipoprotéines -

TEMOINS			TRAITES		
Nº des lapins	Avant	Après	Nº des lapins	Avant	Après
7	30,I	40,6	8	20,I	I0I,7
9	2I,0	8I,3	I0	I2,9	
11	II,4	55,I	I2	8,9	6I,7
I3	26,2	56,6	I4	I4,9	60,0
I5	20,2	20	I7	I0,I	40,2
I8	40,9	54,7	20	I5,9	32,0
2I	62,6	96,2	22	40,5	63,3
Moyennes	30,3	55,2	Moyennes	I7,6	50,8

On ne note pratiquement qu'une différence très minime chez les sujets traités.

- Cholestérolémie en grammes pour cent millilitres -

TEMOINS			TRAITES		
Nº des lapins	Avant	Après	Nº des lapins	Avant	Après
7	0,I3	I,84	8	0,072	3,072
9	0,09	3,3I	I0	0,03	
II	0,025	2,8	I2	0,055	3,06
I3	0,09	2,6	I4	0,055	0,26
I5	0,I	2,I35	I7	0,053	I,32
I8	0,I05	2,255	20	0,06	I,6
2I	0,I55	2,93	22	0,067	2,32
Moyennes	0,I42	2,55	Moyennes	0,056	I,94

La cholestérolémie est moins élevée dans le groupe traité.

- Lipides totaux en grammes pour cent millilitres -

TEMOINS			TRAITES		
Nº des lapins	Avant	Après	Nº des lapins	Avant	Après
7	0,355	2,285	8	0,I95	4,945
9	0,24	3,585	I0	0,I2	
II	0,2	3,I4	I2	0,2	
I3	0,3I	2,625	I4	0,I7	
I5	0,275	2,435	I7	0,I2	I,8I
I8	0,395	2,3I	20	0,I3	I,675
2I	0,445	4,I0	22	0,29	3,87
Moyennes	0,3I7	2,925	Moyennes	0,I75	3,075

Les lipides totaux sont les mêmes dans les deux conditions.

- Electrophorèse libres du sérum -

Des électrophorèses ont été pratiquées sur des pool de sérum. Il s'agit des lapins n'ayant reçu que du cholestérol : deux mois à un gramme de cholestérol par jour et ne présentant pas de lésions.

Résultats exprimés en :	Fractions	TEMOINS		TRAITES	
		Avant	Après	Avant	Après
Pourcentages	Alb.	5I,I	58,9	50,6	48,4
	α 1	I4,4	7,7	II,5	I3,6
	α 2	I0,4	I4,9	I2,5	6,6
	α total	24,8	22,6	24	20,2
	β	I7,6	II,0	I7,2	23,9
	γ	6,5	7,5	8,2	7,5
	Alb/glob.	1,04	1,43	1,02	0,93
grammes par litres	Alb.	36,7	45,3	33,4	32,7
	α 1	I0,4	5,9	7,6	9,2
	α 2	7,5	II,5	8,3	4,4
	α total	I7,9	I7,4	I5,9	I3,6
	β	I2,7	8,5	II,3	I6,I
	γ	4,7	5,8	5,4	5,I
	Alb/Glob.	I,04	I,43	I,02	0,93

L'albumine n'est pas augmentée ; le goupe alpha 2 plus bêta est inchangé.

- Lésions aortiques -

TEMOINS		TRAITES	
7	+	8	+++
9	+++	I0	+++
II	++	I2	0
I3	++	I4	+
I5	+++	I7	+
I8	+++	20	+
21	++++	22	++
Total	I8 +		II +

Les animaux traités ont des dépôts inférieurs de 38,8 % par rapport aux animaux témoins.

VII - DEUXIEME SERIE D'EXPERIENCE

1º) - Conditions expérimentales

Tous les lapins reçoivent I,5 gramme de cholestérol par jour pendant soixante jours soit au total 90 grammes. Si la dose totale est la même que dans l'expérience précédente, le rythme d'administration est différent.

Les lapins traités reçoivent en plus la même quantité de mélange étudié que dans l'expérience précédente.

Cette expérience a été réalisée en I959.

A - Poids des lapins (moyennes)

Témoins		Traités	
Avant	Après	Avant	Après
2,300 g	2,850 g	2,370 g	2,425 g

- Protéines totales en grammes pour cent millilitres -

TEMOINS			TRAITES		
Nº des lapins	Avant	Après	Nº des lapins	Avant	Après
23	6,80		24	7,45	8,70
VI	7,I5	II,00	V2	6,60	9,70
V3	6,45	8,70	V4	6,55	8,75
V5	7,92	I0,30	V6	8,55	9,75
V7	8,05	9,85	V8	6,95	I0,I0
V9	6,65	9,I5	VI0	6,75	9,70
VII	6,45	8,40	VI2	6,45	8,80
VI3	7,75	I0,50	VI4	6,50	8,80
VI5	7,35	9,05	VI6	8,I5	9,60
VI7	6,85	9,20	VI8	7,25	8,80
Moyennes	8,I4	9,87	Moyennes	7,I2	9,27

Pas de modifications notables.

- Bêta-lipoprotéines -

TEM			TRAITES		
Nº des lapins	Avant	Après	Nº des lapins	Avant	Après
23	I5,6		24	54,0	28I
VI	26,3	425	V2	26,8	I37
V3	29,3	I52	V4	29,2	389
V5	24,0	364	V6	4I,I	299
V7	32,9	27I	V8	40,5	478
V9	24,3	339	VI0	II,7	302
VII	20,3	I77	VI2	20,0	253
VI3	43,4	2I4	VI4	3I,3	294
VI5	27,6	I99	VI6	2I,2	343
VI7	24,8	I67	VI8	7,2	I4I
Moyennes	46,8	33I	Moyennes	27,5	29I,7

Les bêta-lipoprotéines sont un peu diminuées chez les sujets traités.

- Cholestérolémie en grammes pour cent millilitres -

TEMOINS			TRAITES		
N° des lapins	Avant	Après	N° des lapins	Avant	Après
23	0,068	3,I5	24	0,I2	I,69
VI	0,095	2,28	V2	0,065	I,I2
V3	0,I	0,7I	V4	0,I2	I,52
V5	0,072	I,42	V6	0,I32	I,IO
V7	0,07	I,02	V8	0,I05	I,88
V9	0,067	I,34	VIO	0,035	I,42
VII	0,06	0,64	VI2	0,05	I,07
VI3	0,073	0,85	VI4	0,I23	0,94
VI5	0,II5	0,82	VI6	0,I45	I,06
VI7	0,095	0,67	VI8	0,055	0,82
Moyennes	0,08I	I,29	Moyennes	0,095	I,262

La cholestérolémie est très légèrement diminuée chez les sujets traités.

- Lipides totaux en grammes pour cent millilitres -

TEMOINS			TRAITES		
N° des lapins	Avant	Après	N° des lapins	Avant	Après
23	0,275	4,65	24	0,49	I,86
VI	0,48	2,745	V2	0,28	I,44
V3	0,I65	0,86	V4	0,345	2,02
V5	0,205	I,8	V6	0,32	I,46
V7	0,32	I,85	V8	0,27	I,94
V9	0,2	I,77	VIO	0,I45	I,6I
VII	0,245	0,9I	VI2	0,2I5	I,775
VI3	0,4	I,6I	VI4	0,36	I,73
VI5	0,504	I,275	VI6	0,47	2,065
VI7	0,26	I,II5	VI8	0,245	I,52

Les lipides totaux sont très légèrement modifiés chez les

- Lésions aortiques -

TEMOINS		TRAITES	
23	++++	24	+
VI	++++	V2	+++
V3	+	V4	+
V5	++	V6	++++
V7	++++	V8	+
V9	++	VI0	+++
VII	++++	VI2	++
VI3	++	VI4	++
VI5	+	VI6	+++
VI7	+++	VI8	++
Total	27 croix	Total	22 croix

Les lapins traités ont donc des dépôts lipidiques inférieurs à ceux des lapins témoins de I9,5 %.

- Electrophorèses libres du sérum -

Des électrophorèses libres ont été pratiquées sur des sérums de lapins témoins et de lapins traités. Les tableaux suivants donnent les résultats numériques.

R E S U L T A T S

Résultats exprimés en :	Fractions	Avant			Après		
		VI	V3	VI7	VI	V3	VI7
Pourcentages	Alb.	60,5	54,2	5I,7	36,5	59,5	5I,4
	α 1	8,2	9,3	8,7	3,8	I,6	I0,4
	α 2	7,7	7,3	I4,5	8,7	I,6	4,6
	α total	I5,9	I6,6	23,2	I2,5	3,2	I5
	β	I0,8	I7,5	I3,4	34,5	24,8	24,3
	γ	I2,8	II,7	II,5	I6,5	I2,5	9,3
	Alb/Glob.	I,53	I,I8	I,07	0,57	I,46	I,06
Grammes par litres	Alb.	43,3	35	35,4	40,I	5I,7	47,2
	α 1	5,9	6	6	4,2	I,4	9,6
	α 2	5,5	4,7	9,9	9,6	I,4	4,2
	α total	II,4	I0,7	I5,9	I3,8	2,8	I3,8
	β	7,7	II,I	9,2	38	2I,6	30
	γ	9,I	7,5	8	I8,I	I0,9	8,6
	Alb/Glob.	I,53	I,I8	I,07	0,57	I,46	I,06

T R A I T E S

Résultats exprimés en :	Fractions	Avant			Après		
		V2	V4	VI8	V2	V4	VI8
Pourcentages	Alb.	56,8	53,5	64,2	44	38,8	49,I
	α 1	I3,8	I3,I	8,5	I0,8	I3,8	2,8
	α 2	8,2	5,9	6,4	24,I	20,9	6,8
	α total	22	I9	I4,9	34,9	34,7	9,6
	β	I4	2I,2	I3,I	I6,2	2I,3	3I,8
	γ	7,2	6,3	7,8	4,9	5,2	9,5
	Alb/Glob.	I,3I	I,I5	I,79	0,66	0,63	0,96
Grammes par litres	Alb.	37,5	35	46,5	42,7	34	43,I
	α 1	9,I	8,6	6,2	I0,5	I2,I	2,5
	α 2	5,4	3,9	4,6	23,3	I8,3	6
	α total	I4,5	I2,5	I0,8	33,8	30,4	8,5
	β	9,2	I3,9	9,5	I5,7	I8,6	28
	γ	4,8	4,I	5,7	4,8	4,5	8,4
	Alb/Glob.	I,3I	I,I5	I,79	0,66	0,63	0,96

En résumé :

- pour l'albumine :

1º) - Avant traitement

Témoins : 34,4 %	37,5 grammes par litre
Traités : 37,5 %	37 grammes par litre

2º) - Après traitement

Témoins : 5I %	46 grammes par litre
Traités : 45 %	38 grammes par litre

- pour le complexe alpha 2 plus bêta :

1º) - Avant traitement

Témoins : 24,8 %	I7 grammes par litre
Traités : 22,5 %	I6,5 grammes par litre

2º) - Après traitement

Témoins : 3I %	29,2 grammes par litre
Traités : 37 %	32 grammes par litre

L'albumine est inchangée chez les lapins traités et un peu augmentée chez les lapins non traités. Pour le complexe alpha 2 il n'y a aucun changement.

VIII - TROISIEME GROUPE D'EXPERIENCE

1º) - Conditions expérimentales

Cette expérience est destinée à juger des variations des lipides sanguins des animaux soumis à de fortes doses de cholestérol n'ayant provoqué aucun dépôt aortique. Elle comporte quatre séries :

A - série normale

B - série normale recevant IO millilitres du mélange étudié

C - série recevant 0,50 gramme de cholestérol par jour

D - série recevant 0,50 gramme de cholestérol par jour et IO millilitres du mélange étudié.

La durée de l'expérience a été de deux mois en I960.

2º) - Résultats

Les protéines totales, les lipides totaux, le cholestérol sont exprimés en grammes pour IOO millilitres ; l'albumine est exprimée en pourcentage des protéines totales.

- Groupe A au début de l'expérience -

Nº Lapins	Protéines totales	Alb.	Cholestérol	Lipides tº	β-lipoprotéines
1	8,I	45,5	0,095	0,3I0	0,80
5	8,75	56,4	0,043	0,205	0,40
9	7,65	49,8	0,045	0,2I5	0,80
I3	7,05	60	0,047	0,365	0,60
I7	7,95	6I,6	0,077	0,3	0,60
2I	7,65	52,2	0,065	0,2	0,60
25	7,35	5I,8	0,050	0,260	illisible
29	7,35	59	0,047	0,245	illisible
33	8,4	62,6	0,053	0,205	illisible
Moyenne	7,8	55,4	0,058	0,256	0,63

- Groupe A à la fin de l'expérience -

Nº Lapins	Protéines totales	Alb.	Cholestérol	Lipides tº	β-lipoprotéines
1	6,35	67	0,I	0,I85	illisible
5	6,6	66,4	0,050	0,255	illisible
9	6,05	67	0,I53	0,425	0,80
I3	6,6	66,4	0,075	0,370	0,80
I7	7,0	7I,3	0,072	0,325	0,80
2I	6,35	73,3	0,056	0,240	0,80
25	6,7	67,5	0,I55	0,475	0,90
29	5,95	69,5	0,050	0,345	illisible
33	7,05	67,8	0,052	0,305	illisible
Moyenne	6,5I	68,4	0,085	0,325	0,82

Les lipides totaux, le cholestérol, les bêta-lipoprotéines augmentent.

- Groupe B au début de l'expérience -

Nº Lapins	Protéines totales	Alb.	Cholestérol	Lipides tº	β-lipoprotéines
2	7,65	5I,5	0,038	0,340	0,80
6	7,65	56,3	0,065	0,I95	0,60
I0	8,4	55,4	0,II2	0,440	I,I0
I4	7,45	54,I	0,035	0,270	0,40
I8	8,25	6I,2	0,097	0,370	0,60
22	6,65	56,2	0,045	0,I55	0,40
26	7,8	58,6	0,095	0,295	illisible
30	8,2	5I,2	0,047	0,I35	illisible
34	7,95	5I,7	0,063	0,I80	0,60
Moyenne	7,75	55,I	0,066	0,264	0,64

- Groupe B à la fin de l'expérience -

Nº Lapins	Protéines totales	Alb.	Cholestérol	Lipides tº	β-lipoprotéines
2	5,55	74,5	0,I06	0,445	illisible
6	5,5	52,7	0,062	0,305	illisible
I0	6,4		0,020	0,2I5	0,40
I4	7,45	48,8	0,056	0,330	0,60
I8	6,3	6I,I	0,I95	0,620	3,25
22	6,8	6I,6	0,062	0,440	0,6
26	7,I	64,5	0,067	0,390	illisible
30	5,95	67,I	0,062	0,I75	illisible
34	7,0	52,5	0,022	0,220	illisible
Moyenne	6,45	60,3	0,072	0,353	I,2I

Les lipides totaux, le cholestérol, les bêta-lipoprotéines augmentent.

- Groupe C au début de l'expérience -

Nº Lapins	Protéines totales	Alb.	Cholestérol	Lipides tº	β-lipoprotéines
3	6,95	52,2	0,I03	0,370	0,40
7	8,35	57,3	0,033	0,I50	0,40
II	8,45	59,6	0,065	0,270	0,80
I5	7,I5	57,8	0,035	0,295	0,40
I9	8,35	44,8	0,090	0,265	0,60
23	8,45	56	0,057	0,I65	0,40
27	7,4	60,I	0,057	0,225	illisible
3I	9,0	5I,2	0,057	0,220	illisible
35	7,4	57	0,059	0,265	0,80
Moyenne	7,94	55,I	0,06I	0,247	0,54

- Groupe C à la fin de l'expérience -

Nº Lapins	Protéines totales	Alb.	Cholestérol	Lipides tº	β-lipoprotéines
3	5,75	63	0,I47	0,2I0	I,40
7	6,05	57,7	0,050	0,250	illisible
II	6,95	66,2	0,354	0,875	3,60
I5	5,65	58,4	0,050	0,230	0,60
I9	7,0	64,2	0,072	0,320	0,80
23	7,45	58,I	0,045	0,470	0,60
27	7,25	63,3	0,I42	0,465	0,90
3I	7,3	67,8	0,I	0,420	illisible
35	6,45	6I,5	0,I35	0,490	0,80
Moyenne	6,65	63,3	0,I2I	0,4I4	I,24

Les lipides totaux, le cholestérol, les bêta-lipoprotéines augmentent.

- Groupe D au début de l'expérience -

Nº Lapins	Protéines totales	Alb.	Cholestérol	Lipides tº	β-lipoprotéines
4	7,35	50,3	0,065	0,290	0,40
8	6,5	47,7	0,030	0,I55	0,40
I2	7,9	57,I	0,052	0,235	0,80
I6	8,I5	44,8	0,030	0,360	0,60
20	8,05	53,5	0,085	0,290	0,40
24	8,05	52,8	0,065	0,245	0,60
28	7,8	55	0,062	0,275	illisible
32	9,5	5I	0,095	0,350	illisible
36	8,05	55,5	0,04I	0,I95	0,60
Moyenne	7,92	5I,7	0,052	0,246	0,54

- Groupe D à la fin de l'expérience -

Nº Lapins	Protéines totales	Alb.	Cholestérol	Lipides tº	β-lipoprotéines
4	6,25	52,I	0,037	0,270	illisible
8	5,7	6I,6	0,047	0,250	illisible
I2	6,3	60,I	0,I65	0,480	0,80
I6	5,6	56,7	0,I40	0,460	2
20	5,95	54,2	0,095	0,326	0,80
24	6,25	64,5	0,067	0,285	0,80
28	7,2	55	0,I50	0,450	0,80
32	7,95	64,5	0,070	0,230	illisible
36	8,6	53	0,027	0,560	0,80
Moyenne	6,64	57,9	0,088	0,367	1

Les lipides totaux, le cholestérol, les bêta-lipoprotéines augmentent.

En comparant les groupes A et B aux groupes C et D, on note une légère influence sur la cholestérolémie pour les groupes C et D.

IX - QUATRIEME GROUPE D'EXPERIENCE

1º) - Conditions expérimentales :

Cette expérience a eu lieu de la fin d'année I960 au début d'année I96I.

Les lapins ingèrent le mélange étudié. La dose journalière pour chaque animal comporte :

Hydrolysat d'albumine bovine	I,50 g
Acides aminés fructosés	0,028 g
Glucose	0,040 g
Acide adénosine triphosphorique	0,005 g
Eau distillée q.s.p.	30 ml

L'expérience comporte quatre groupes d'animaux :

A - groupe de contrôle recevant une alimentation standard,

B - groupe recevant outre l'alimentation standard 30 ml du mélange étudié,

C - groupe recevant quotidiennement un gramme de cholestérol avec l'alimentation standard,

D - groupe recevant quotidiennement outre l'alimentation standard un gramme de cholestérol et 30 ml du mélange étudié.

2º) - Résultats :

Les résultats sont donnés dans les tableaux suivants.

Poids des lapins (moyennes)

	Poids initial	Poids final
A	3.295 g	3.260 g
B	3.530 g	3.700 g
C	3.505 g	3.550 g
D	3.450 g	3.535 g

- Série A (Provende seule) -

Nº des lapins	Cholestérol		Kunkel		Lésions aortiques
	Initial	Final	Initial	Final	
70	0,04	0,048	I0,4	7,I	0
7I		0,II6	I0,4	I0,4	0
72	0,057	0,063	5,8	I0,4	0
73	0,032	0,084	4	I8,8	0
74	0,075	0,224	5,2	3I,2	0
75	0,030	0,064	4	22,I	0
76	0,042	0,075	5,8	37	0
77	0,052	0,I75	6,5	38,3	0
78	0,057		5,2		0
79		0,250		28	0
Moyennes	0,047	0,II6	6,3	23,5	0

- Série B (Provende + mélange étudié) -

Nº des lapins	Cholestérol		Kunkel		Lésions aortiques
	Initial	Final	Initial	Final	
60	0,045	0,II3	4	7,I	0
6I	0,035	0,075	4,5	9,I	0
62	0,092	0,063	6,5	6,5	0
63	0,032	0,I94	6,5	24,7	0
64	0,065		5,2		0
65	0,075	0,I7	5,8	22,I	0
66	0,062		7,8	I7,5	0
67	0,060	0,I6I	9	I5,6	0
68	0,092	0,I67	I0,4	II,7	0
69	0,047	0,095	5,8	I4,4	0
Moyennes	0,060	0,II7	6,5	I4,3	0

Les séries A et B sont semblables : le mélange étudié est sans action dans ces conditions.

- Série C (Provende + Cholestérol) -

Nº des lapins	Cholestérol		Kunkel		Lésions aortiques
	Initial	Final	Initial	Final	
50	0,042	0,465	4	33,8	+
5I	0,037	0,I94	4,5	I5,6	0
52	0,072	0,238	8,4	I9,5	+
53	0,050	0,46	4	I24,8	++
54	0,04	0,255	6,5	22,I	++
55	0,03	0,27	2,6	22,7	+
56	0,052	0,245	2,6	I5,6	0
57	0,072	0,405	6,5	57,2	+
58	0,065	0,46	2,6	I35,2	++++
59	0,062	0,436	2,6	39,6	0
Moyennes	0,052	0,33	3,8	73,6	I2 +au total

- Série D (Provende + Cholestérol + Mélange étudié) -

Nº des lapins	Cholestérol		Kunkel		Lésions aortiques
	Initial	Final	Initial	Final	
40	0,042	0,284	4	33,8	0
4I	0,052	0,62	4	I35,2	++
42	0,045	0,46	4	83,2	0
43	0,042	0,62	4,5	I63,8	++
44	0,057	0,II8	4,5	8,4	0
45	0,035	0,46	3	I04	+
46	0,037	0,354	3	52	0
47	0,047	0,28	4	36	0
48	0,062	0,436	4	45,5	0
49	0,080	0,46	6,5	84,5	0
Moyennes	0,050	0,4	4,I5	50,3	5 + au total

Donc :

- pas d'action sur la cholestérolémie,
- action très nette sur les dépôts de la paroi artérielle.

X - CINQUIEME GROUPE D'EXPERIENCE

1º) - Conditions expérimentales :

Cette expérience a été réalisée en I96I. Elle comporte deux groupes de lapins :

- une première série qui reçoit du cholestérol à raison d'un gramme par jour,
- une deuxième série qui reçoit outre un gramme de cholestérol quotidien, trente millilitres du mélange étudié (pour la composition du mélange voir 4º groupe).

Ce mélange est administré par voie orale.

2º) - Résultats :

Poids des lapins (moyennes)

	Poids initial	Poids final
1º série	3.3II g	3.400 g
2º série	3.49I g	3.279 g

- Cholestérol et lipides du sérum en grammes pour I00 ml -

PREMIERE SERIE TEMOIN					DEUXIEME SERIE TRAITEE				
Nº des lapins	Cholestérol Avant	Cholestérol Après	Lipides totaux Avant	Lipides totaux Après	Nº des lapins	Cholestérol Avant	Cholestérol Après	Lipides totaux Avant	Lipides totaux Après
1	0,050	0,035	0,220		I3	0,050	0,040	0,I45	0,II5
2	0,045	0,073	0,235		I4	0,090		0,3I0	
3	0,060	0,053	0,230		I5	0,040	0,054	0,I30	0,285
4	0,040	0,04I	0,I95		I6	0,045	0,I46	0,I55	0,I85
5	0,045	0,II5	0,270		I7	0,050	0,I00	0,I65	0,I80
6	0,040	0,062	0,230		I8	0,075	0,057	0,275	0,I75
7	0,040	0,020	0,205		I9	0,060	0,078	0,240	0,I85
8	0,050	0,026	0,I75		20	0,060	0,I05	0,3I5	0,205
9	0,040	0,065	0,2I5		2I	0,050	0,086	0,200	0,230
I0	0,035	0,038	0,I90		22	0,065	0,II5	0,2I5	0,260
II	0,060	0,044	0,285		23	0,065	0,058	0,250	0,I45
I2	0,045	0,04I	0,I20		24	0,065	0,083	0,225	0,2I5
Moyennes	0,045	0,05I	0,2I4		Moyennes	0,056	0,084	0,2I8	0,I98

Le cholestérol parait légèrement augmenté.

Lésions aortiques à l'examen direct

Première série		Deuxième série	
1	0	I3	0
2	0	I5	0
3	+	I6	0
4	+	I7	0
5	+	I8	0
6	+	I9	0
7	+	20	0
8	0	2I	0
9	+	22	0
I0	+	23	0
II	+	24	0
I2	+		

Les résultats de l'analyse chromatographique des lipides extraits des aortes de ces lapins sont donnés au troisième chapitre.

CHAPITRE DEUXIEME

Mise au point de l'analyse chromatographique

I - LE MATERIEL BIOLOGIQUE

Nous avons utilisé soit des aortes humaines soit des aortes animales (aortes de lapins). Pour que les lipides de ces aortes se solubilisent dans les solvants organiques, il est nécessaire de les déshydrater. Nous utilisons pour cela la lyophilisation au moyen d'un protocole codifié au laboratoire (I5). Le mode opératoire est le suivant :

Les aortes sont recueillies aussitôt après le sacrifice. Si la lyophilisation n'intervient pas immédiatement, elles sont conservées en chambre froide à - 25ºC. Nous séparons pour les conserver l'intima et la média. De petits fragments de ce tissu frais (entre un et deux grammes) sont introduits dans des flacons tarés et pesés. La lyophilisation achevée, ces flacons sont placés dans un dessicateur sous vide en présence d'anhydride phosphorique. Ceci nous permet de conserver à l'abri de l'air et de l'humidité les fragments qui ne sont pas soumis immédiatement à l'analyse. Le tissu déshydraté est pesé. La différence entre poids frais et poids sec nous permet de calculer la teneur en eau.

Pour l'extraction des lipides, le tissu est réduit en poudre à l'aide d'un moulin électrique a couteaux. Pour éviter un échauffement excessif cette opération est menée dans une chambre à - 25ºC où le matériel a séjourné avant l'opération. C'est une quantité connue de cette poudre qui est soumise à l'extraction. Les opérations qui nécessitent l'exposition à l'air du tissu déhydraté (pesée, broyage) sont menées le plus rapidement possible.

Les aortes de lapins nous ont posé un problème particulier : leur finesse ne nous a pas permis la séparation par dissection de l'adventice d'une part, de l'intima et de la média de l'autre. Il était cependant nécessaire d'éliminer soigneusement la graisse péri-artérielle particulièrement abondante. Nous avons procédé ainsi :

l' aorte est étirée sur un doigt, intima en dessous. La surface extérieure est dégraissée au ciseau fin. Puis on la racle soigneusement à l'aide d'un scalpel.

II - EXTRACTION DES LIPIDES

L'extraction est menée à l'aide du couple méthanol anhydre/éther éthylique. L'opération s'effectue dans un bécher à la température ambiante. On s'aide d'un agitateur magnétique (barreau en Teflon).

Le temps de contact poudre-solvant a été estimé de la façon suivante : on met la poudre dans le solvant à raison de cent millilitres de solvant par gramme de poudre. On agite pendant une heure. On laisse reposer. Le solvant décanté est centrifugé puis filtré sur verre fritté (Nº 4 - Porosité IO-20 microns). Il est évaporé sous vide à basse température (37ºC) au moyen d'un évaporateur rotatif. Le résidu est pesé. L'on recommence l'opération jusqu'à ce que l'on ne recueille plus de lipides. Le tableau suivant résume une des opérations :

Qté de poudre lyophilisée	Temps de contact	Qté de solvant en millilitres	Lipides en grammes
I,420 g	0 / I heure	I50	0,093
	I / 2 heure	I50	0,0I6
	2 / 3 heure	I50	0,007
	3 / 4 heure	I50	trace(1/20mg)

Nous avons adopté le schéma d'extraction suivant : la poudre est mise en contact avec le solvant pendant quatre heures. Chaque heure le solvant est renouvelé à raison de I00 millilitres par gramme de poudre. Les différentes fractions sont réunies, centrifugées, filtrées sur verre fritté ; le solvant est évaporé ; le résidu est transvasé quantitativement dans un petit récipient taré adaptable à l'évaporateur rotatif. Le solvant de reprise est évaporé. Le récipient est ensuite placé en dessicateur, sous vide en présence d'anhydride phosphorique, jusqu'à poids constant. On obtient par pesée différentielle les lipides totaux.

III - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE

Pour séparer le complexe lipidique extrait de nos aortes nous avons choisi la chromatographie sur colonne d'acide silicique. Nous avons essayé la méthode décrite par HIRSCH et AHRENS (20) de préférence à celle de FILLERUP et MEAD (16) parce qu'elle nous permettait de traiter de plus grosses quantités de lipides.

1º - Matériel

Une colonne de verre pyrex de dimensions intérieures : 250 mm de haut et 18 mm de diamètre est entourée d'une jaquette permettant une circulation d'eau à température constante. Elle est reliée à un ballon de 1200 millilitres par un rodage normalisé (R.I.N. 3). Le ballon est fermé par une tubulure à rodage permettant de faire passer un courant d'azote. L'azote a pour but de réduire l'oxydation des lipides d'une part et de diminuer le temps nécessaire à la chromatographie par application d'une légère pression (3 à 4 cm de mercure) au sommet de la colonne. Les pièces sont munies d'ergots qui permettent de les fixer par des bracelets de caoutchouc. La pression étant faible, ces bracelets suffisent à éviter toute fuite. Ballon et colonne sont munis de robinets. Dans le ballon un flotteur de pyrex lesté au mercure permet de maintenir une bulle de gaz au dessus du solvant dans la colonne.

Le bain thermostatique est un bac de 60 litres. L'eau est maintenue à 25º à l'aide d'une résistance chauffante commandée par un thermomètre de contact au 1/10. L'eau est brassée continuellement par un agitateur et par une pompe de circulation (débit : 2 litres par minute). Des essais nous ont montré que la température était constante à l'intérieur de la colonne après une heure de circulation. Lorsque la température ambiante est supérieure à 25º, il est nécessaire de faire circuler de l'eau dans le bain thermostatique à l'aide d'un serpentin de cuivre.

2º - L'adsorbant

Nous avons utilisé de l'acide silicique Mallinkrodt (100 mesh) dit "Suitable for chromatographie analysis, by the method of RAMSEY and PATTERSON". Cet acide, contrairement au "silica gel" de fabrication anglaise permet l'élution des phospholipides (25).

3º - Solvants

Nous utilisons les solvants suivants :

- Méthanol : il doit être anhydre. Une rectification soigneuse permet d'obtenir un produit contenant moins de I % d'eau. L'alcool absolu est alors préparé par action du magnésium : dans un ballon muni d'un réfrigérant a reflux on met en contact IO grammes de magnésium en poudre pour un litre de méthanol. La réaction s'amorce d'elle-même jusqu'à l'ébullition du solvant. Une fois le magnésium disparu on maintient l'ébullition pendant une heure. On rectifie alors soigneusement en prenant de sévères précautions contre l'humidité. On conserve à l'obscurité, en flacon bouché émeri, muni d'un chapeau en verre scellé à la parrafine. Le mieux est de préparer le méthanol peu de temps avant la chromatographie. Si le produit de la première rectification contient plus de I % d'eau, il est nécessaire d'activer le magnésium par de l'iode : un gramme d'iode pour cinq grammes de magnésium. On chauffe doucement. Lorsque des vapeurs d'iode se dégagent on ajoute une partie du méthanol. On fait bouillir jusqu'à disparition du magnésium. On ajoute alors le reste de l'alcool et on fait bouillir à reflux pendant trente minutes. Il ne reste plus qu'à rectifier soigneusement (I4 - 23).

  Sur le produit ainsi obtenu, la recherche des impuretés réductrices est négative : on ajoute à IO ml de méthanol O,I ml d'une solution de permanganate de potassium O,I N. La coloration rose persiste plus de I5 minutes.

- Ether éthylique : L'éther éthylique est le produit R.P. utilisé tel quel.

- Acétone : L'acétone utilisé comme déshydratant de l'acide silicique est le produit R.P. redistillé avant chaque chromatographie.

- Ether de pétrole : L'éther de pétrole du commerce dit "35/70" présente deux inconvénients :

  . il contient des carbures non saturés : on s'en débarasse en lavant le produit avec de l'acide sulfurique concentré. Les proportions éther acide sont 3 : I v/v/ On agite le produit avec l'acide dans une ampoule à décanter pendant une heure environ à chaque passage ; on continue jusqu'à ce que l'acide sulfurique reste incolore. Le nombre de passage est variable avec les échantillons d'éther de pétrole. Les gouttelettes d'acide ou les produits sulfonés qui peuvent rester en mélange sont éliminés par une solution diluée de carbonate de sodium. On lave ensuite trois fois à l'eau distillée. On déshydrate ensuite facilement à l'aide d'anhydride phosphorique. La solubilité de l'eau dans les carbures saturés est en effet négligeable (I4).

  . ce produit peut renfermer des carbures de poids moléculaire élevé qui ne seront pas éliminés lors de l'évaporation du solvant : ce qui, vu la grande quantité de ce solvant utilisé, peut fausser les pesées. Pour pallier à cet inconvénient on n'utilise que la fraction comprise entre 35 et 50º et on procède à une rectification soigneuse menée très lentement (23).

4º - Préparation de la colonne

L'adsorbant doit être activé : en fait déshydraté et de façon aussi reproductible que possible. On pèse dix-huit grammes d'acide silicique pris dans un lot qui a passé une nuit à l'étuve à 105º. On garnit le fond de la colonne d'un tampon de laine de verre lavé à l'éther de pétrole. L'acide est introduit par petites fractions que l'on tasse par de petites tapes sur la colonne. On complète le tassement à l'aide du vide fourni par une trompe à eau. Le sommet est garni d'un petit tampon de laine de verre lavé à l'éther de pétrole. Ce tampon protège le sommet de la colonne lors des changements de solvant.

On met en route le bain thermostatique. Les solvants sont également portés et maintenus à 25º (ceci permet d'éviter la rupture de la colonne par bouillonnement lors de leur introduction).

Quand la température est équilibrée on procède au lavage déshydratant : on fait passer successivement :

- 10 millilitres d'éther éthylique
- 30 millilitres d'un mélange éther éthylique/acétone (1 vol./1 vol.)
- 20 millilitres d'éther éthylique.

Ce lavage a pour but de compléter de façon constante et reproductible la déshydratation de l'acide silicique. On chasse toute trace de ces solvants par lavage à l'éther de pétrole pendant douze heures (20).

La colonne est alors prête pour la chromatographie.

5º - Chargement de la colonne

Le complexe lipidique de poids connu est dissous dans un minimum d'éther de pétrole. Il est introduit au sommet de la colonne. Le flacon est lavé deux fois avec de très petites quantités d'éther de pétrole qui sont rajoutées au sommet de la colonne. Celle-ci est ensuite lavée avec quelques millilitres d'éther de pétrole. Puis on applique les solvants en s'aidant d'une légère pression d'azote. On prend bien soin de ne pas laisser sécher le sommet de la colonne. A la fin de chaque fraction, on lave soigneusement l'embout de la colonne à l'aide d'une"giclée" d'éther de pétrole pour récupérer les petites quantités de graisses qui peuvent s'y déposer.

6º - Exécution de l'analyse

Le poids de lipides pouvant être séparés peut aller, d'après la littérature, jusqu'à 50 milligrammes par gramme d'acide silicique. Mais en fait le dixième de cette quantité est seul acceptable. Une charge supérieure donne (25), et nous l'avons constaté, une interférence entre les fractions. Il n'est pas souhaitable que les fractions dépassent 50 milligrammes.

En pratique nous avons évité de charger la colonne avec plus de 100 milligrammes de lipides.

Nous avons utilisé le schéma d'élution suivant :

FRACTION	CORPS ELUES	COMPOSITION DU SOLVANT D'ELUTION				
I	Esters de stérols	350 ml	d'éther de pétrole	contenant	I %	d'E.E.
		60 ml	"	"	4 %	"(1)
II	Triglycérides	240 ml	"	"	4 %	"
		200 ml	"	"	8 %	"
III	Cholestérol libre	450 ml	"	"	8 %	"
		50 ml	"	"	25 %	"
IV	Diglycérides	200 ml	"	"	25 %	"
V	Monoglycérides	300 ml d'éther éthylique				
VI	Phospholipides	400 ml de méthanol absolu				

Nous avons procédé aux essais suivants :

- chromatographie de mélanges artificiels,
- chromatographie de lipides de la paroi aortique.

Les mélanges artificiels étaient constitués de la façon suivante :

. Stéarate ou palmitate de cholestérol (2)

. Tripalmitine B.D.H.

. Cholestérol "Prolabo".

(1) - E.E. = éther éthylique

(2) - Nous remercions Monsieur FERON qui nous a fourni gracieusement des esters du cholestérol d'une grande pureté.

Voici les résultats :

1º mélange : Stéarate de cholestérol .. 0,0495 gramme
Tripalmitine ..... 0,044 gramme
Cholestérol ..... 0,050 gramme

Fraction	Poids récupéré	% de récupération
I	0,049 g.	100
II	0,042 g.	95,5
III	0,047 g.	94

2º mélange : Stéarate de cholestérol .. 0,044 gramme
Tripalmitine ..... 0,048 gramme
Cholestérol ..... 0,033 gramme

Fraction	Poids récupéré	% de récupération
I	0,044 g.	100
II	0,046 g.	96
III	0,032 g.	97

Les récupérations de la tripalmitine et du cholestérol ont été améliorées par une purification par recristallisation avant chromatographie. Les fractions ont été contrôlées :

- par la présence (I,III) ou l'absence (II) de réaction de Liebermann,
- par la précipitation par la digitonine (III),
- enfin par chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique selon la technique de Cormier et Jouan (8).

La pesée des fractions s'effectue de la façon suivante : la majeure partie du solvant d'élution est évaporée sous pression réduite et à basse température (37ºC) dans un évoporateur rotatif. Quand il ne reste plus qu'une petite quantité de solvant on la transfère quantitativement dans un petit tube taré adaptable à l'évaporateur rotatif. On achève alors la dessication et on pèse le résidu sec.

Ensuite on a soumis à l'analyse des extraits lipidiques d'aorte humaine. Une première fois on a recueilli les solvants d'élution dans les tubes d'une collectrice de fraction à raison de IO ml par tubes ; ceci afin de vérifier les interférences possibles entre les fractions. Le tableau suivant résume cet essai.

Ml d'éluants	Réactions pratiquées	Fractions
0		
	Liebermann Pas de précipitation par la digitonine	I
4IO		
	Pas de Liebermann	II
850		
	Liebermann Précipitation par la digitonine	III
I350		
	Pas de Liebermann	IV
I550		
	Pas de phosphore	V
I850		
	Phosphore	VI
2250		

Lors du passage d'une fraction à une autre les réactions étaient pratiquées sur tous les tubes, le solvant ayant été préalablement évaporé. La charge de colonne était de 98 milligrammes. Les dernières traces de produit élué passent :

- pour les esters : avec les 60 ml d'éther de pétrole à 4 % d'éther éthylique.
- pour le cholestérol libre : IO à 20 ml avant la fin des 50 ml à 25%.

Les tubes contenant les tryglicérides ne donnent pas la réaction de Liebermann.

Les phospholipides ne passent qu'au tiers des 400 ml de méthanol absolu. Par contre, ils sont complètement élués 30 à 40 ml avant la fin.

Cette méthode est délicate. Il faut surveiller attentivement le passage d'une fraction à l'autre pour nettoyer l'embout de colonne : il y a en effet une évaporation importante et une petite quantité de la fraction en cours d'élution s'y dépose.

Un autre essai a été mené en recueillant les fractions en entier. Il s'agissait d'un extrait lipidique d'aorte humaine athéromateuse. La pureté des fractions a été contrôlée par chromatographie sur papier. Voici les résultats :

Charge de colonne : 0,9I9 g

Esters du cholestérol	0,0286	33 %
Triglycérides	0,0055	6 %
Cholestérol libre	0,0I72	20 %
Diglycérides	0,0034	4 %
Monoglycérides	0,0043	5 %
Phospholipides	0,0276	32 %
	0,0866	

Nous avons essayé d'augmenter la charge de colonne. Nous avions pris 0,I77 g d'un extrait lipidique d'aorte athéromateuse. Mais la fraction Ester de stérol dépassait 50 milligrammes et elle contaminait les triglycérides.

La pression d'azote injecté dans la colonne est contrôlée par un manomètre à mercure : elle est de 3 à 4 cm de mercure, sous cette pression la chromatographie dure trois jours. Une pression supérieure donne des interférences entre les fractions.

IV - ESSAI D'ISOLEMENT DES PHOSPHOLIPIDES PAR DIALYSE A TRAVERS UNE MEMBRANE DE CAOUTCHOUC

Dans le but de simplifier l'analyse chromatographique, nous avons essayé d'isoler préalablement les phospholipides suivant la technique préconisée par Van BEERS, de IONGH et BOLDINGH (2) : la dialyse du complexe lipidique à travers une membrane de caoutchouc. D'après les auteurs cette technique permet de séparer les phospholipides, qui restent dans le dialyseur, des autres lipides qui passent dans le liquide de dialyse.

Comme dialyseur nous avons utilisé un doigtier en caoutchouc pur de huit centimètres de long fait d'une feuille de 0,5 mm d'épaisseur (le terme "caoutchouc pur" est une spécification commerciale). Ce doigtier a été soigneusement lavé à l'éther de pétrole. Ce lavage a pour but d'éliminer le talc et les constituants solubles du caoutchouc. Il est adapté à un tube de pyrex de 26 mm de diamètre et de 130 mm de haut. Le doigtier plonge dans de l'éther de pétrole (35/60) contenu dans un Bécher de 250 ml. On agite au moyen d'un agitateur magnétique (barreau en Teflon).

Nous avons vérifié la solubilité dans l'éther de pétrole de notre échantillon de caoutchouc. Pour celà nous avons plongé un doigtier dans l'éther de pétrole (200 ml) pendant 24 heures en renouvellant six fois le solvant. Les différentes fractions collectées ont été évaporées sous vide. Nous n'avons pas trouvé de résidu mesurable par pesée.

Le premier essai a été purement qualitatif. Un extrait lipidique d'aorte humaine a été mis en dialyse pendant douze heures. Le solvant a été renouvelé toutes les heures. L'agitation est difficile puis impossible pendant les dernières heures : le doigtier s'étend et s'étale sur le fond.

Au bout de douze heures on recueille le résidu au fond du doigtier ; d'autre part le dialysat est concentré sous vide. On pratique sur ces deux fractions une chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique :

- le dialysat ne contient plus de phospholipides,
- par contre, la fraction dite "phospholipides" montre une tâche ayant migré à l'examen chromatographique comme un témoin de Tripalmitine.

Nous avons procédé à un deuxième essai, quantitatif celui-là.

Un extrait lipidique d'aorte humaine a été divisé en deux parts : la première de 0,100 gramme a été mise en dialyse pendant douze heures, le dialysat et la fraction dite phospholipides ont été évaporés sous vide et pesés :

- fraction dite phospholipides : 0,045 gramme
- résidu sec du dialysat : 0,055 gramme.

La seconde de 0,0866 gramme a été soumise à l'analyse chromatographique sur colonne d'acide silicique. Les résultats sont les suivants :

Esters du cholestérol	0,0286	33 %
Glycérides	0,0132	15 %
Cholestérol libre	0,0172	20 %
Phospholipides	0,0276	32 %

Il apparait une différence considérable entre les pourcentages donnés par l'une et l'autre méthode.

La fraction dite phospholipide obtenue par dialyse est soumise à une chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique en présence de trois témoins : tripalmitine, stéarate de cholestérol, cholestérol. Cette fraction comporte une tache de phospholipides et une tache ayant migré comme le témoin de stéarate de cholestérol.

Il est possible que la qualité du caoutchouc soit responsable de cet insuccès.

Nous avons abandonné cette méthode.

CHAPITRE TROISIEME

Application : extraction des lipides de l'aorte de lapin et séparation en quatre classes par chromatographie sur colonne d'acide silicique.

1º) - Résultats personnels

Les aortes proviennent du cinquième groupe des expériences décrites dans le premier chapitre.

La petite quantité de tissu sec obtenue nous a contraint à grouper les aortes trois par trois. Nous n'avons pu utiliser le moulin électrique : les pertes eussent été trop importantes. Nous avons du nous contenter de les diviser au ciseau en très petits fragments ; ceci à l'intérieur du solvant pour éviter toute perte. Nous avons porté le temps d'extraction à douze heures en renouvelant six fois le solvant. La dernière fraction du solvant ne laissait aucun résidu après évaporation.

Les tableaux I et II fournissent les données numériques obtenues. Les poids sont donnés en grammes.

Les tableaux III et IV fournissent les données obtenues par chromatographie. Les aortes ayant été conservées un certain temps, nous avons groupé ensemble les glycérides (di-, tri-,mono-) par crainte d'une hydrolyse possible.

- I -

Nº des lapins	Poids frais	Poids sec	% d'eau	Lipides		
				totaux	% de poids frais	% poids sec
1,2,3	I,838	0,534	7I,5	0,II2	6,I	2I
4,5,6	2,I76	0,645	70,5	0,I38	6,3	2I,2
7,8,9	I,073	0,326	69,5	0,065	6	20
I0,II,I2	I,I52	0,346	70	0,072	6,2	2I

Les lapins 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, I0, II, I2 ont reçu en plus de leur nourriture habituelle, le régime hypercholestérolé soit journellement : 1 gramme de cholestérol et 3 grammes d'huile d'olive.

- II -

Numéro des lapins	Poids frais	Poids sec	% d'eau	Lipides totaux	Lipides % poids frais	Lipides % poids sec
I3, I5, I6, I7, I8	2,286	0,668	70	0,064	2,8	9,5
I9, 20, 2I	I,38	0,396	7I,5	0,036	3,9	I3,6
22, 23, 24	I,307	0,364	72	0,054	4,I	I5

Les lapins de ce groupe (nº I3 à 24) ont reçu en plus de leur nourriture habituelle : le régime hypercholestérolé : 1 gramme de cholestérol, 3 grammes d'huile d'olive et 30 cm^3 d'hydrolysat par jour.

- III -

	POOL Nº I (4, 5, 6)		POOL Nº II (7 à I2)	
Esters du cholestérol	0,003 g	2,95 %	0,002 g	2,5 %
Glycérides	0,063 g	62,50 %	0,053 g	66,5 %
Cholestérol libre	0,007 g	6,95 %	0,006 g	7,5 %
Phospholipides	0,028 g	27,60 %	0,0I9 g	23,5 %
	0,I0I g		0,080 g	

- IV -

	POOL Nº III (I3 à 2I)		POOL Nº IV (I9 à 24)	
Esters du cholestérol	0,004 g	5 %	0,003 g	4,5 %
Glycérides	0,044 g	60 %	0,039 g	58,5 %
Cholestérol libre	0,0I4 g	I7 %	0,0I2 g	I8 %
Phospholipides	0,0I5 g	I8 %	0,0I3 g	I9 %
	0,077 g		0,067 g	

La seule difficulté particulière a été la collecte et la pesée de très petites fractions : les esters du cholestérol et le cholestérol libre. Les pourcentages fournis par les chromatographies ont permis de calculer les teneurs en grammes par I00 grammes de tissu sec. Les chiffres sont les suivants :

Groupe témoin

	Esters de stérol	Glycérides	Cholestérol libre	Phospholipides
I	0,630	I3,4	I,49	5,9
II	0,505	I3,5	I,5I	4,8
Valeur moyenne	0,567	I3,45	I,5	5,3

Groupe traité

III	0,490	5,I	I,72	I,83
IV	0,530	6,8	2,I2	2,28
	0,5I	5,9	I,92	2,05

2º) - Les lipides dans l'aorte de lapin soumis à un régime athérosclérogène

L'exploration des données de la littérature est délicate. Le matériel d'analyse varie : aorte entière ou plaques ; les trois tuniques ou deux seulement. Les méthodes de dessication et d'extraction varient également. Les unités en lesquels les résultats sont exprimés ne peuvent pas toujours être comparées. C'est surtout le cholestérol et quelquefois les phospholipides qui ont fait l'objet de dosages.

Weinhouse et Hirsch (I940) donnent des résultats pour des lapins normaux et pour des lapins soumis à un régime athérosclérogène (24). Les aortes de lapins normaux sont entières, celles de lapins traités ont été disséquées et l'adventice retiré. Les résultats sont fournis en pourcentage de tissu frais. Le pourcentage d'eau du tissu est également donné.

Témoins normaux : humidité : 68,6 %

Chol.libre	Chol.total	Ch.esters	Phospho.	Graisses neutres	Lip.Ttx
0,I9	0,22	0,06	I,0I	4,25	5,5I

après 260 jours de régime : humidité : 67,7 %

3,22	4,27	I,76	3,26	3,26	II,5

En I954, Horlick et Duff (I8) extraient le cholestérol d'aortes de lapins soumis au régime athérosclérogène au moyen d'alcool chaud. L'adventice a été retirée. Les résultats sont donnés en milligrammes par aorte :

	Cholestérol libre	Cholestérol total
1)	8,76 mg	24,96 mg
2)	I3,8 mg	22,9 mg

En I956, Hirsh et Nailor (I9) donnent la composition des lipides du tissu artériel de lapin "athéroscléreux". Les résultats sont exprimés en pourcentage des lipides totaux :

	Intima	Premières plaques	Média
Chol. libre	I4,2	I6,2	I7,3
Chol. ester.	38,6	38,7	I6,7
Phosphol.	20,I	I9,0	34,I
Graisses neutres	27,I	26,3	3I,9

Constantinides (I956) donne le cholestérol par aorte en milligrammes de tissu frais (9).

- trois mois de régime athérosclérogène : 7 mg de cholestérol pour 99I mg de tissu frais,
- cinq mois de régime athérosclérogène : I0,I mg de cholestérol pour I267 mg de tissu frais.

Curran (11),outre des chiffres de lapins au régime,donne des chiffres normaux. L'extraction se fait par l'alcool/acétone. Le tissu a été séché par l'air à 80º.

- Lapins normaux : 2,5 à 4,5 mg de cholestérol par gramme d'aorte sèche,
- Lapins "athéroscléreux" : 26,6 mg de cholestérol par gramme d'aorte sèche.

Day (I956) extrait au chloroforme méthanol à chaud (I2). Il dose le phosphore en plus du cholestérol mais exprime les résultats en milligrammes par aorte sans indication du poids des aortes.

Gradation de l'athérome	Cholestérol total	Phospholipides
0	2,2 mg	I,6 mg
I	4 mg	2,8 mg
II	5,6 mg	2,4 mg
III	7,4 mg	3,5 mg
IV	II mg	I,8 mg
V	I5,4 mg	6,7 mg

Constantinides (I958) dose le cholestérol total d'aorte dont il a retiré l'adventice (I0). Il donne le poids du tissu dont il a extrait le cholestérol : I,I7 mg de cholestérol pour 805 mg de tissu frais.

Brainard (I959) donne également le cholestérol en le rapportant à un poids de tissu frais (I4). Il s'agit de lapins ayant reçu un régime athérosclérogène :

et $\begin{matrix}4,5\\6,6\end{matrix}$ mg par gramme de tissu frais.

Schwenck (I959) exprime ses résultats dans les mêmes unités mais donne également des chiffres normaux (2I) :

- Lapins normaux : 0,9 mg par gramme d'aorte fraiche
- Lapins "athéroscléreux" : 5 mg à 6,4 mg par gramme d'aorte fraiche.

Byers (I960) rapporte son taux de cholestérol aortique à I00 grammes de tissu sec (6) :

0,8I à 0,89 par I00 grammes de tissu sec.

Enfin, Schwenck (I96I) obtient 2,I à 3,8 mg de cholestérol par gramme d'aorte fraiche.

Nous avons groupé ces résultats dans un tableau. Pour pouvoir relier tous ces chiffres, nous avons recalculé, lorsque c'était possible, les taux en grammes par I00 grammes de tissu sec. Lorsque le pourcentage d'eau n'est pas fourni par l'auteur nous avons utilisé arbitrairement un pourcentage de 72 %. Nous ne nous dissimulons absolument pas ce que cet arbitraire a de contestable, mais comment disposer autrement d'une base de comparaison ?

Résultats exprimés en grammes pour I00 g. de tissu sec

TABLEAU I

WEINHOUSE et HIRSCH. I940					
Matériel	Lipides ttx	Chol.libre	Chol.ester.	Graisses neut.	Phosphol.
aorte norm. entière 69 % d'eau	I7,7	0,6I	0,I9	I3,7	3,25
aorte mal. intima+média 68 % d'eau	34,6	I0,00	5,5	I0,I	I0,I

TABLEAU II

-Cholestérol total dans l'aorte du lapin normal (sans régime)-

Auteur	Date	Matériel	Cholestérol total
Weinhouse	I940	aorte entière	0,80
Curran	I956	aorte entière	0,250
Schwenck	I959	aorte entière	0,3I0

Cholestérol total dans l'aorte du lapin soumis au régime athérosclérogène

Weinhouse	I940	intima + média	I5,5
Hirsch-Nailor	I956	plaques athéromateuses	24,4
Constantinides	I956	aorte totale	2,5I à 5,46
Curran	I956	aorte totale	2,66
Constantinides	I958	intima + média	0,532 à I,6
Brainard	I959	aorte totale	2,75 et I,78
Schwenck	I959	aorte totale	2,23

Byers	I960	aorte totale	0,8I0 et 0,890
Schwenck	I96I	aorte totale	0,750 et I,35
Enselme	I96I	aorte totale	2,06

On voit qu'il existe une nette différence entre aorte totale et portions d'aortes. Pour le lapin normal le cholestérol aortique semble être aux environs de 0,300 g. pour I00 g. de tissu sec, ceci pour l'aorte totale. Chez le lapin athéroscléreux, toujours pour l'aorte totale le chiffre oscille autour de 2 g 33 pour I00 g. de tissu sec.

=-=-=-=-=-=-=-=-

- C O N C L U S I O N S -

Ce travail comporte deux parties :

I - Partie expérimentale

Nous avons étudié l'action sur la paroi artérielle du lapin soumis à un régime athérosclérogène d'un mélange d'acides aminés, de fructo-aminoacides de BORSOOK et d'A.T.P.

Ce mélange est destiné à aider au maintien ou à la restauration de l'intégrité de la paroi artérielle en augmentant la synthès protéique.

1º) - Ce mélange administré par voie parentérale a, dans deux séries d'expériences, provoqué une diminution des lésions macroscopiques de l'aorte.

2º) - Ce même mélange, administré par voie orale, présente une activité de même type, mais moindre, tout au moins en regard des critères adoptés.

II - Partie analytique

Nous nous sommes orienté vers une estimation quantitative des lipides totaux de l'aorte d'une part et des différentes classes de ces lipides d'autre part : glycérides, cholestérol libre et estérifié, phospholipides. Nous avons donc été amené à mettre au point une technique de séparation quantitative d'un complexe lipidique par voie chromatographique.

Cette technique a été appliquée à la dernière série d'expérience relatée.

1º) - Les lapins traités présentent une baisse des lipides totaux de l'aorte.

2º) - L'étude du complexe lipidique montre chez les lapins traités une baisse des glycérides et des phospholipides.

Le Président de la Thèse :

Professeur ENSELME

VU et permis d'imprimer

LYON, le 6 Décembre 1961

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université,

P. LOUIS,

VU, le Doyen

H. HERMANN,

- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -

1 - ABRAMS (A), LOWY (P.H.) and BORSOOK (H.) -
Preparation of 1-amino-1-deoxy-2-ketohexoses from aldohexoses and α-aminoacids.
J. Amer. Chem. Soc. 1955, 77, (3), 4794-4796.

2 - VAN BEERS (G.J.), de IONGH (H.) and BOLDINGH (J.) -
Isolation of phospholipids by dialysis through a rubber membrane.
in Essential fatty acides : 1 vol. 268 p., H.M. Sinclair, Butterworth, London, 1958, 43-47.

3 - BORSOOK (H.), ABRAMS (A.) and LOWY (P.H.) -
Fructo-aminoacids in liver : stimuli of aminoacids incorporation in vitro.
J. Biol. Chem. 1955, 215, 111-124.

4 - BRAINARD (J.B.) -
Effect of prolonged exercise on atherogenesis in the rabbit.
Proc. Soc. Exp. Biol. 1959, 100, 244-246.

5 - BURSTEIN (M.) et SAMAILLE (J.) -
Sur une nouvelle méthode de dosage des bêta-lipoprotéines du sérum.
Path. Biol. 1958, 6, (7-8), 541-549.

6 - BYERS (S.O.) and FRIEDMAN (M.) -
Effect of infusions of phosphatides upon the atherosclerotic aorta "in situ" and as an ocular aortic implant.
J. Lipid Research. 1960, 1, (4), 343-348.

7 - COURTOIS (J.E.) et DELRIEU (P.) -
Emploi de l'acide phytique pour déterminer les groupes basiques des protéines totales du sérum.
Path. Biol. 1958, 6, (21-22), 1637-1650.

8 - CORMIER (M.) et JOUAN (P.) -
Séparation des lipides totaux du sérum sanguin par chromatographie sur papier.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1958, 1, 171-176.

9 - CONSTANTINIDES (P.), SAUNDERS (P.) and WOOD (A.) -
Effect of sulfated polysaccharides on preestablished atherosclerosis.
A.M.A. Arch. Path. 1956, 62, 369-379.

IO - CONSTANTINIDES (P.), GUTMANN-AUERSPERG (N.) and HOSPES (D.) -
Acceleration of intimal atherogenesis through prior medial injury.
A.M.A. Arch. Path. I958, 66, 247-254.

II - CURRAN (G.L.) and COSTELLO (R.L.) -
Reduction of excess cholesterol in the rabbit aorta by inhibition of endogenous cholesterol synthesis.
J. Exp. Med. I956, I03, (I), 49-56.

I2 - DAY (A.J.) and WILKINSON (G.K.) -
Severity of atherosclerosis in rabbits in relation to serum lipids and to aorta cholesterol content.
Austral. J. Exp. Biol. I956, 34, 423-432.

I3 - DELSAL (J.L.) -
Nouveau procédé d'extraction des lipides du sérum par le méthylal. Applications aux microdosages du cholestérol total, des phosphoaminolipides et des protéines.
Bull. Soc. Chim. Biol. I944, 26, 99-I05.

I4 - FAURE (M.) -
Purification des solvants organiques.
in Loiseleur (J.) : Technique de laboratoire, 1 volume, 926 p., Masson, Paris, I954, 7I5-733.

I5 - FREY (J.) -
Recherches relatives à l'extraction des protéines aortiques sur des fragments normaux et athéroscléreux.
Thèse doctorat Médecine, LYON, I960.

I6 - FILLERUP (D.L.) and MEAD (J.F.) -
Chromatographie separation of the plasma lipids.
Proc. Soc. Exp. Biol. I953, 83, 574-577.

I7 - FLEURY (P.) et Melle EBERHARD (R.) -
Recherches sur le dosage des protéines par la méthode photométrique au biuret selon la technique de GORNALL.
Ann. Biol. Clin. I95I, 9, 453-466.

I8 - HORLICK (L.) and LYMAN DUFF (G.) -
Heparin in experimental atherosclerosis in the rabbit.
II - The effect of heparin on the regression of atherosclerosis.
A.M.A. Arch. Path. I954, 57, 495-500.

I9 - HIRSCH (E.F.) and NAILOR (R.) -
Atherosclerosis. IV - The relation of the composition of the blood lipids to atherosclerosis in experimental hyperlipemia.
A.M.A. Arch. Path. I956, 6I, 469-487.

20 - HIRSCH (J.) and AHRENS Jr. (E.H.) -
The separation of complex lipide mixtures by the use of silicic acid chromatography.
J. Biol. Chem. I958, 233, 3II-320.

2I - SCHWENCK (E.), STEVENS (D.F.) and ALTSCHUL (R.) -
Experiments on cholesterol atherosclerosis in rabbits.
Proc. Soc. Exp. Biol. I959, I02, 42-45.

22 - SCHWENCK (E.), OMORI (Y.) and JAOCHIM (E.) -
Deposition of cholesterol and cholestanol in experimental rabbit atherosclerosis.
Proc. Soc. Exp. Biol. I96I, I07, 83-85.

23 - VELLUZ (L.) -
Note sur les solvants purs.
in Substances naturelles de synthèse, Masson, I95I, vol. I4I p. (I03-II9).

24 - WEINHOUSE (S.) and HIRSCH (E.F.) -
Atherosclerosis. II - The lipids of the serum and tissues in experimental atherosclerosis of rabbits.
A.M.A. Arch. Path. I940, 30, 856-867.

25 - WREN (J.J.) -
Chromatography of lipids on silicic acid.
J. Chromatog. I960, 4, I73-I95.

26 - WRENN (H.T.) and FEICHTMEIR (T.V.) -
The quantitation of albumin based on its dye bending capacity.
Amer. Clin. Path. I956, 26, 960-968.

-=-=-=-=-=-=-=-

- T A B L E D E S M A T I E R E S -

INTRODUCTION 6

CHAPITRE PREMIER :

Du rôle des acides aminés de la sérum albumine, des fructo-aminoacides et de l'A.F.P. sur la formation des dépôts lipidiques et l'imprégnation de l'aorte dans "l'athérosclérose" expérimentale du lapin 7

CHAPITRE DEUXIEME :

Mise au point de l'analyse chromatographique 33

CHAPITRE TROISIEME :

Application : extraction des lipides de l'aorte de lapin et séparation en quatre classes par chromatographie sur colonne d'acide silicique 44

CONCLUSIONS 51

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 52

-=-=-=-=-=-=-